云 南 植 物 研 究 5(1):121—125, 1983
Acta Botanica Yunnanica

烟草原生质体再生的愈伤组织与冠瘿组织分化的比较*

张 鉴 铭
(中国科学院昆明植物研究所)

COMPARISON OF DIFFERENTIATON BETWEEN CALLI FROM PROTOPLASTS OF NICOTIANA TABACUM AND ITS CALLI OF CROWN GALLS

Zhang Jianming
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

普通烟草（*Nicotiana tabacum* L.)原生质体培养成植株的研究国内外已有不少报道[1—7]。我们研究了红花大金元品种的烟草叶肉原生质体培养成植株的条件，并考虑到由根癌土壤杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）诱导的烟草冠瘿及其畸胎瘤与正常细胞有显著差别，它们在不加任何激素的培养基上细胞能继续分裂，增殖[8—10]。如果冠瘿及畸胎瘤组织与原生质体再生的愈伤组织在分化芽和根方面也有差别，那末，利用它与正常细胞融合后，有可能提供更多的筛选杂种的条件，我们对这两种细胞在同样条件下分化芽和根的情况作了比较研究。

材 料 和 方 法

原生质体的分离和培养 原生质体的分离和纯化按以前报道的方法[11]进行，但从酶液中漂浮原生质的蔗糖液浓度改为30%（重量/体积），漂洗时蔗糖液浓度改为25%。

原生质体培养是用修改的K培养基[12]，培养方法是平板培养、浅层液体培养及微室悬滴培养同时进行[12, 13]。在25°±1°C光强约为1000勒克司的日光灯连续光照下培养。

冠瘿组织的诱导培养 冠瘿是用根瘤土壤杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*)702菌株诱发烟草红花大金元的茎髓组织产生的[10]。它被培养在不加激素的MS[14]及G[12]

本文于1981年12月28日收到。

* 原始的冠瘿组织系本所王钧同志提供，特此致谢。

培养基上，每月切成边长约5 mm 小块转接一次作继代培养，在25°C下黑暗（图1－A）和约1000勒克司连续光照（图1－B）条件下培养。本实验所用的是培养10代以后都不分化畸胎瘤的稳定冠瘿系702（图1－A，B）。培养中有的冠瘿组织在连续光照下自发地长出了畸形的叶和芽状的组织，呈丛生状。把它从原冠瘿组织上分离下来后，在同样不加激素的培养基上培养，仍能继续照原样增殖。每月切成小丛转接一次作继代培养形成畸胎瘤系702T（图1－C）。畸胎瘤系702T的一些畸形芽的茎节伸长形成外形较正常的芽（图2）。

分化比较培养 分化培养基是用K[12]及NT[1]的无机盐类及维生素类再加入20克/升蔗糖，8克/升琼脂。分化芽时加入1 ppm 6-BA与0.5ppm IAA 或者2.5ppm 6-BA 与0.2ppm NAA。分化根时不加入激素或加入0.2ppm NAA。由原生质体再生的愈伤组织长到1 mm 时转移到分化芽的培养基上。同时把切成边长约5 mm 的冠瘿组织接种在同样培养基上，培养在同样条件下比较芽的分化。由原生质体再生的芽的叶片长到约2 cm时，切下芽转移到分化根的培养基上作分化根的对比试验。

结 果 及 讨 论

原生质体的培养 原生质体经培养一个月以后，在液体和平板培养中（K培养基）都可以长成直径约1 mm 的愈伤组织。这时可以将愈伤组织转移到分化芽的培养基上培养，在两种激素组合的分化芽的培养基上愈伤组织都可以分化出芽（图3－B）。培养基的基本成分及激素组合对芽的分化都有一定的影响（表1）。在含有1 ppm 6-BA与0.5 ppm IAA 的NT培养基上芽分化较快，20多天即可看长出的芽，芽长得较健壮，但每块愈伤组织上长出的芽数目较少。而在同样激素组合的K培养基上要30多天才能分化

表1 愈伤组织与冠瘿分化芽的比较

实验材料，情况			培养基K				培养基 NT			
			1*6-BA	0.5 IAA	2.5 6-BA	0.2 NAA	1 6-BA	0.5 IAA	2.5 6-BA	0.2 NAA
愈伤组织	一次实验	40天	8/8**	绿	0/6	绿	8/8	绿	0/5	微绿
		70天	8/8	深绿	5/6	绿	8/8	绿	1/5	微绿
	三次实验统计		15/20	75%	8/20	40%	16/22	73%	13/20	65%
冠瘿组织	一次实验 G、黑暗	40天	0/5	白	0/5	微绿	0/5	白	0/5	微绿
		70天	0/5	白褐	0/5	褐	0/5	深褐	0/5	褐
	实验 MS、光照	40天	0/7	褐	0/8	褐	0/8	褐	0/8	褐
		70天	0/7	黑褐	0/8	黑褐	0/8	黑褐	0/8	黑褐
	三次实验统计		1/20		0/21		0/21		0/21	

*，单位：ppm。 **表示：分化的愈伤组织数/接种的愈伤组数。

***，仅只长出一个3×3 mm的叶状物。

表 2　　原生质体再生的芽与畸胎瘤的芽分化根的比较

实验材料	培养基K				培养基NT			
	不加激素		0.2ppm NAA		不加激素		0.2ppm NAA	
原生质体再生的芽	9/12*	75%	5/6	83%	14/15	93%	8/10	80%
畸胎瘤的芽	0/8		0/7		0/9		0/15	

* 表示：生根的芽数/转接的芽数，转接20天以后，三次实验统计。

出芽来，但分化芽的数目较多，每块愈伤组织可长出数十个芽，呈丛生状。而在2.5ppm 6-BA与0.2 ppm NAA 激素组合的两种培养基上，芽的分化都较晚，要40多天以后才能分化出少数芽来。愈伤组织分化芽的频率在 40—75%。当芽的叶片长到 2 cm 时，切下芽转移到分化根的培养基上使其生根。在这些培养基上，一般在10天后都能分化出根（图 4-B）。表 2 列出了各种培养基上分化根的情况，一般分化根的频率都很高。以不加激素的NT 培养基分化根的频率最高，达到93%，生根也较早，在转接后第六、七天就长出根来。其他品种烟草的原生质体都在 NT 类型的培养基上被培养成植株，而红花大金元品种烟草的叶肉原生质体在修改的K培养基上能顺利的再生成植株。

培养条件对冠瘿和畸胎瘤生长的影响　最初移植来的冠瘿组织是未长畸胎瘤的。在不加激素的MS及G培养基上在连续光照下培养一个月后，在MS 培养基上的冠瘿大约一半自发地长出畸形的叶和芽状物，被称之为畸胎瘤[8，9，10]，在G培养基上长出的畸胎瘤很少。把不分化的冠瘿和畸胎瘤分别培养，畸胎瘤继续生长出同样的畸形叶和芽，形成畸胎瘤系702T。其中有些叶状物长到1—2cm 后，由于细胞增殖加快变得肥厚，变成了团块状而又重新长出畸形的芽，也有的畸形芽从叶状物的中脉或边缘直接长出来，这些都再形成畸胎瘤。另外有少数畸形芽在MS培养基上茎节伸长，叶也变得像正常的叶，长成了外形较正常的芽(图 2)，取这种芽在分化根的培养基上作根分化的对比试验。

不生成畸胎瘤的冠瘤系 702 分别在光照和黑暗条件下继代培养。光照下培养的呈淡绿色（图 1-B），培养在MS培养基上的有少数冠瘿再次产生畸胎瘤，产生的畸胎瘤再次分离出来作畸胎瘤系，在G培养基上的不易产生畸胎瘤。在黑暗下培养的不分化的冠瘿组织生长较均匀，白色（图 1-A），不易产生畸胎瘤，只有在 MS 培养基上的冠瘿偶尔产生极少数的畸胎瘤。无论是在光照还是在黑暗条件下培养在 MS 培养基上的冠瘿一个月后开始变为黄褐色而衰老，二个月后大部分冠瘿呈黑褐色，转接后不再生长已死亡。而培养在G培养基上的冠瘿二个月后仍然新鲜呈白色，转接后仍能很好生长。这表明，培养基和培养条件对冠瘿的生长及畸胎瘤的产生及生长都有很大的影响。用G培养基在黑暗条件下培养冠瘿系 702 可保持不分化畸胎瘤的稳定性。在G培养基上在光照条件下培养畸胎瘤系702T，可以保持其稳定性，很少长成较正常的芽。

原生质体再生的愈伤组织与冠瘿组织分化的比较　在分化芽的培养基上，由原生质体再生的愈伤组织能很好分化出芽来；而不分化的冠瘿组织，无论是在光照或黑暗条件下培养的，无论是在 MS 或G培养基上培养的，都未发现芽的分化（表 1）。即使培养时间长达70天之久，大部分冠瘿组织已变成黑褐色死亡，也未看到芽的分化。在转接的80

多块冠瘿组织中，仅有一块在34天后长出一个约 3 × 3 mm 的叶状物，培养70天也未发育成芽。由此可见本实验采用的这个冠瘿系702细胞在这些分化培养基上是不易分化芽的。

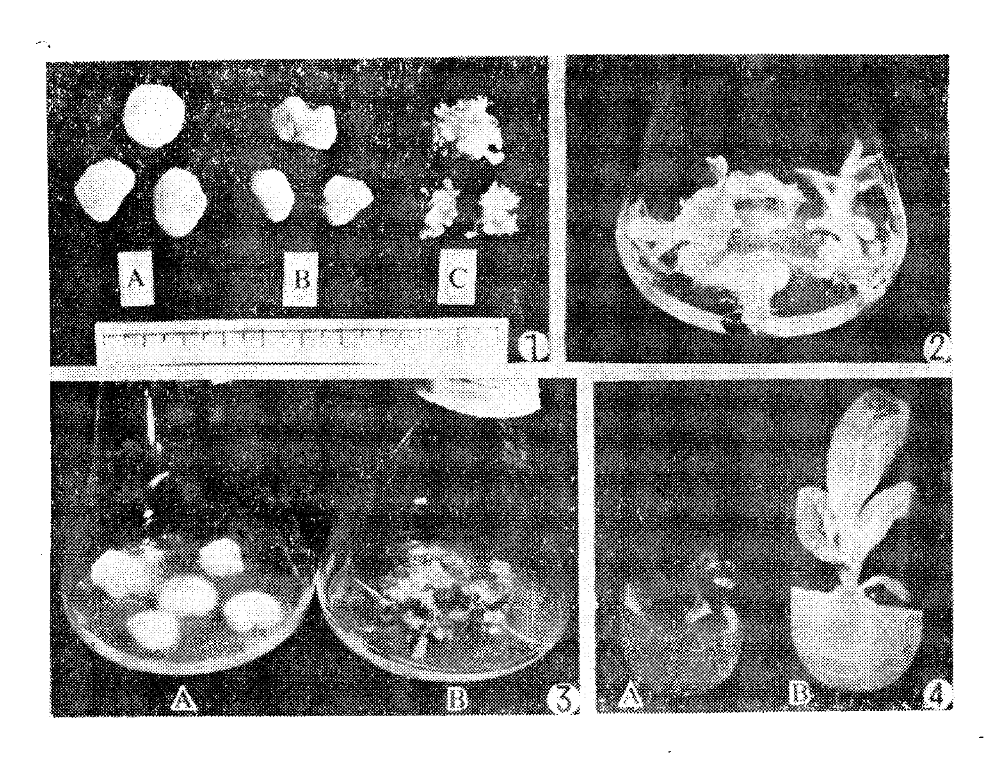


图1 冠瘿组织：A. 黑暗下培养；B. 光照下培养；C. 畸胎瘤。图2. 畸胎瘤的外形正常的芽。图3. 芽分化的比较：A. 未分化芽的冠瘿；B. 原生质体再生的愈伤组织分化的芽。图4. 根分化的比较：A. 畸胎瘤的芽未分化根；B. 原生质体再生的芽分化了根。

不分化的冠瘿、畸胎瘤及其外形较正常的芽在不加激素的MS和G培养基上培养都是不长根的。把外形较正常的芽切下转移到分化根的K和NT培养基上与原生质体愈伤组织再生的芽作分化根的对比试验（表2）。从表2可以看出，在这些培养基上，从原生质体来的芽，其分化根的频率为75—93%。而从畸胎瘤来的芽都不生长根。

经过继代培养选出来的冠瘿系702及畸胎瘤系702T，在不加激素的培养基上仍具有生长增殖的特性。加之，冠瘿系702细胞在正常细胞能分化芽的培养基上，它不分化芽的特点；畸胎瘤系702T产生的芽在正常的芽能分化根的培养基上它不分化根的特点。这两类细胞系用来作细胞融合，可以考虑利用它们的这些特性，在培养初期或可能在分化芽或根的阶段筛选出杂种细胞和杂种植株。在不同种的正常细胞与冠瘿细胞融合后是否也会发生象同种的这两类细胞融合后不易分化根的情况[15]还有待实验研究。

参 考 文 献

〔1〕 Nagata, T. and I. Takebe, 1971; Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, 99: 12—20.

〔2〕 Bajaj, Y. P., 1972: Protoplast culture and regeneration of haploid tobacco plants. *Amer. J. Bot.* 59: 647.

〔3〕 Ohyama, K. and J.P. Nitsh. 1972: Flowering haploid plants obtained from protoplasts of tobacco leaves. *Plant and Cell Physiol.*, 13: 229—236.

〔4〕 Takebe, I. and T. Nagata. 1973: Culture of isolated tobacco mesophyll protoplasts. Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Vègètales. P. 175—187. Paris C. N. R. S. No. 212.

〔5〕 上海植物生理研究所细胞杂交组，1977: 烟草叶肉原生质体培养成植株的研究。遗传学报，4(3):233—241.

〔6〕 孙勇如，李文彬、李向辉，1979: 培养基对烟草叶肉原生质体再生细胞的分裂及植株再生的影响。遗传学报，6(4): 428—434.

〔7〕 蔡起贵、钱迎倩，周云罗、吴素萱，1977: 烟草 (*Nicotiana tobacum*) 原生质体再生成植株及影响植株分化的某些因素。中国科学，(4): 347—356.

〔8〕 Marton, L., G. J. Wullems, L. Molendijk and R. A. Schilperoort, 1979: In vitro transformation of cultured cells from Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens. *Nature*, 277: 129—311.

〔9〕 Scott, I. M., 1979: Opine content of unorganised and teratomatous tobacco crown gall tissues. *Plant Science Letters*, 16: 239—248.

〔10〕 王钧、万石双、李英，1981: 植物冠瘿的诱导培养和植株再生。云南植物研究. 3(4): 441—448.

〔11〕 张鉴铭、匡安秀，1982: 植物原生质体的纯化。云南植物研究，2(3): 315—318.

〔12〕 张鉴铭，1980: 培养矮牵牛叶肉原生质体几个较好的培养基。云南植物研究 4(1): 77—82.

〔13〕 张鉴铭，1981: 花烟草 (Nicotian alata) 叶肉原生质体生成植株。植物学报，23(6) 496—498.

〔14〕 Murashige, T. and F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15: 473—497.

〔15〕 Wullems, G. J., L. Molendijk and R. A. Schilperoort, 1980: The expression of Tumour Markers in intraspecific Somatic Hybrids of normal and Crown gall Cells from *Nicotiana tabacum*. *Theor, Appl. Genet.* 56:203—208,